



FUNKČNÍ POTENCIÁL IZOLÁTŮ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ Z LUSKOVIN

Miloslava Kavková, Olga Bazalová, Jaromír Cihlář,
Andrea Tůmová

Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o.

Functional potencial of lactic acid bacteria isolated from legumes

Abstrakt

Z rostlin luskovin bylo izolováno spektrum bakterií mléčného kvašení s cílem získat izoláty vhodné pro preventivní i kurativní ošetření osiva a rostlin v biologické či integrované ochraně rostlin. Izoláty *Latilactobacillus sakei* z rostlin a tři kmeny CCDM stejného druhu a jejich extracelulární metabolity byly testovány vůči sěžejním fungálním patogenům luskovin *Sclerotinia sclerotiorum* a *Botrytis cinerea*. V bezbuněčných supernatantech byly hodnoceny fyzikální a chemické parametry jako acidita, obsah a zastoupení organických kyselin a množství a složení proteinů a peptidů. U izolátů *L. sakei* z rostlin se prokázala značná variabilita v produkci organických kyselin zejména v derivátech kyseliny mléčné. Izolát 1905-1 a kmeny CCDM 336 a 717 produkovaly významné množství kyseliny sorbové. Obohacení media o cukry významně navyšovalo produkci proteinů a peptidů ve frakci ≤ 30 kDa, a to zejména u izolátu 1905-1. Přídavek této frakce v objemu 20 % do bramborového agaru s dextrózou zcela inhiboval růst mycelia *Sclerotinia sclerotiorum* a *Botrytis cinerea*. Izoláty *L. sakei* z rostlin vykazovaly efektivní antifungální aktivitu *in vitro* vůči fungálním patogenům luskovin, jejíž podstatou byla produkce funkčních organických kyselin a jejich derivátů, i významná produkce peptidů. Pro potenciální biologickou nebo integrovanou ochranu rostlin lze uvažovat izoláty z luskovin *L. sakei* 7KV1A a 1905-1.

Klíčová slova: antifungální aktivita, *Latilactobacillus sakei*, organické kyseliny, proteiny

Abstract

The spectrum of lactic acid bacteria was isolated from legumes aimed at preventive and curative treatment of the seeds and plants in biological control systems and integrated management. The isolates of *Latilactobacillus sakei* obtained from legumes and tree strains CCDM and its extracellular metabolites were tested against the main fungal pathogens on legumes represented by *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. The physical and chemical parameters, such as acidity, organic acid content and the production of proteins and peptides, were evaluated in cell-free supernatants. The isolates from plants performed high variability in the production of organic acids, particularly in the production of derivatives of lactic acid. The isolate 1905 and strains CCDM 717 and 336 produced significantly sorbic acid. The adjunct of sugars into the MRS medium increased the production of proteins and peptides in the fraction ≤ 30 kDa in the case of isolate 1905-1. Adding this fraction (20%v.v) into potatoe dextrose agar fully inhibited the mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. The isolates of *L. sakei* isolated from legumes showed effective antifungal activity against the plant pathogens because of the production of the functional organic acid and its derivatives and intensive production of peptides. Isolates from legumes *L. sakei* 7KV1A and 1905-1 can be considered for potential biological or integrated plant protection.

Keywords: antifungal activity, *Latilactobacillus sakei*, organic acids, proteins

Úvod

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou v přírodních ekosystémech součástí mikrobiálních konsorcií, jenž v přírodě přirozeně fermentují rostlinnou biomasu. Během vegetační sezóny se vyskytují v mikrobiálních komunitách ve fytoplánu a rhizoplánu rostlin. I když se oproti jiným bakteriím osidlujícím fytoplán či rhizoplán rostlin (*Pseudomonaceae*, *Enterococcaceae*) vyskytují v nižších počtech, díky svým extracelulárním metabolitům ovlivňují mikrobiální složení fytoplánu či rhizoplánu a poskytují rostlinám možnost ochrany před bakteriální-

mi a fungálními patogeny (Motta-Gutierrez a Coccolin, 2023). V epifytické, a i endofytické mikrobiotě rostlin jsou zastoupeny laktobacily (*Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Loigolactobacillus coryniformis*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lactobacillus fermentum*, *Latilactobacillus sakei* aj.), laktokoky, streptokoky i enterokoky (Minervini a kol., 2015; Yu a kol., 2020). Kromě významu BMK pro rostlinná mikrobiální společenstva a potažmo pro zdraví a fitness rostliny, má tento druh význam pro přirozené fermentační procesy rostlinných produktů. Využití izolátů BMK z rostlin nachází uplatnění i pro jiné účely než potravinářské či krmivářské, zejména pak v ochraně rostlin a rostlinných produktů, a to jako ochranné biofilmy, moření osiva či postřiky za účelem ochrany rostlin před mikrobiálními a fungálními patogeny. Cílenému použití předchází charakteristika izolátů a jejich extracelulárních produktů. Významným druhem BMK, který je součástí rostlinných mikrobiálních konsorcií a fermentovaných rostlinných produktů (např. Kimchi) a masných fermentovaných výrobků, je *L. sakei* (Motta-Gutierrez a Coccolin, 2023). Vzhledem k širokému spektru matric, ve kterých se *L. sakei* nachází, a podmínkám prostředí (vakuová balení) je považován za druh s vysokou adaptabilitou vůči oxidativnímu stresu, nízkým teplotám a vyššímu obsahu solí. *L. sakei* je schopný v potravinách degradovat arginin a purinové nukleosidy a svými metabolity chrání potraviny a produkty před nežádoucími mikroorganismy a houbovými organismy (Barbieri a kol., 2022). Kmeny *L. sakei* jsou známe produkci bakteriocinů třídy IIa, jako jsou sakacin Q a sakacin P (Calvarho a kol., 2015), a dalších antimikrobiálních proteinů (Lopez-Arvizu et al., 2021) s účinností vůči patogenním bakteriím. Antifungální aktivita *L. sakei* ssp. *carosum* vůči rostlinným patogenům byla doposud studována jen u rodu *Fusarium* spp., a to s ohledem na biodegradaci mykotoxinů (Mateo a kol., 2023). U izolátu *L. sakei* z Kimchi byla pozorována antifungální aktivita vůči *Penicillium brevicompactum*, i když byly detekovány peptidy, antifungální účinek byl přičítán spíše produkci kyseliny mléčné (Huh a kol., 2016). Při testování antifungálně účinných látek laktobacilů izolovaných ze salámů vůči spektru penicilií a aspergilů se ukázalo, že účinnou látkou v případě *L. sakei* byly fenyl-laktát a hydroxy-fenyl-laktát (Coloretti a kol., 2007). Ve spojení s ochranou rostlin a s fytopatogenními houbami nebyly prozatím účinky extracelulárních produktů *L. sakei* testovány. Využívání BMK izolátů rostlinného původu v zemědělství se z mnoha hledisek ukazuje jako velmi přínosné nejen z hlediska výživy a probiotických vlastností, ale i s ohledem na biodegradaci pesticidů a jejich reziduí v rostlinné biomase. Během tříletého období řešení projektu LEGUMBAC se nám z planě rostoucích luskovin podařilo odizolovat kromě jiných druhů BMK (Kavková a kol., 2023a, b) také šest izolátů *L. sakei*. U izolátů dobře rostoucích v MRS médiu jsme se zaměřili na antifungální aktivitu vůči plísni šedé (*Botrytis cinerea*) a hlízence (*Sclerotinia sclerotivorum*) a na

produkci extracelulárních metabolitů, zejména derivátů kyseliny mléčné a kyselin, které jsou využívány jako konzervanty (Figueroa a kol., 2023).

Materiál a metody

Izolace a identifikace laktobacilů

Z rostlin luskovin byly izolovány bakterie mléčného kvašení způsobem uvedeným Kavková a kol., 2023a, Kavková a kol., 2023b). Izoláty BMK byly identifikovány na základě sekvenací 16S SSU ribozomální RNA a uloženy do pracovní sbírky projektu při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Izoláty *L. sakei* ssp. *sakei* z rostlin (7KV1A, 3KO1A, 3KO2A a 1905-1) schopné růst v MRS byly společně s třemi sbírkovými kmeny; CCDM 339 a 717 (*L. sakei* ssp. *sakei*) a CCDM 776 (*L. sakei* ssp. *carosus*). (testovány vůči významným patogenům luskovin jako je plíseň šedá (*Botrytis cinerea*) (izolát 55-BC1) a hlízence (*Sclerotinia sclerotivorum*) (CCDBC 327). Inhibice myceliálního růstu byly testovány modifikovanou metodou podle Demirbaşı a kol. 2017 (Kavková a kol., 2023a; Kavková a kol., 2023b).

Za účelem testování byly fungální izoláty kultivovány metodou přelivu vytemperovaným bramborovým agarem (PDA, Himedia, Indie), a to tak, že 1 ml inokulum ve formě kapky obsahovalo 1.10^5 konidií ve fyziologickém roztoku. Takto připravené Petriho misky byly kultivovány při $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 dní. Izoláty a kmeny *L. sakei* byly kultivovány 24 h v MRS bujónu s FGGM (fruktóza, glukóza, glukonát sodný a maltóza) bujónu (Himedia, Indie) v 50 ml sterilních falkonách. Po kultivaci byly falkony s nakultivovanou kulturou centrifugovány při 13,600 ot/min po dobu 10 minut a přes mikrobiální stříkačkový filtr (0,22 μl) (Filtratech, Francie) byl získán bezbuněčný supernatant, který byl přes ultrafiltrační kolony AMICON 30 MWO (MERCK, USA) rozdělen na dvě frakce, koncentrát s proteiny a peptidy menšími než 30 kDa a filtrát s proteiny nad 30 kDa. Na základě testování antifungálního účinku laktobacilů z předchozích let (Kavková a kol., 2023b) byl použit koncentrát s frakcí 2–30 kDa.

Vytemperovaný PDA agar byl zaočkován 20% podílem této frakce jednoho konkrétního kmenem či izolátu *L. sakei* a rozlit na Petriho misky. Na každou misku s frakcí laktobacilů byly přeneseny dva terčíky od každého jednoho druhu *B. cinerea* a *S. sclerotivorum* vyříznuté sterilním korkovrtem z nakultivovaných kultur. V jedné variantě byla také použita samotná sklerocia *S. sclerotivorum* místo myceliálních terčíků a bylo hodnoceno jejich obrůstání myceliem. Misky byly umístěny do termostatu ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Radiální růst mycelia byl měřen po 24h intervalech po dobu 5–7 dní. Od okraje každého terčíku byl měřen růst mycelia na čtyřech místech. Růst mycelia z terčíků obou houbových organismů na čistém PDA představoval kontrolní variantu. Celé experimenty včetně kontrol byly opakovány třikrát včetně všech měření. Data byla zpracována v programu Statistica Soft. v.12.1. (StatSoft Europe, Hamburg, Germany) metodou analýzy variance s faktoriálním designem při $p \leq 0,05 \leq \alpha$

Tab. 1 Inhibice radiálního růstu mycelia u dvou fytopatogenních houbových organismů na PDA s 20% v.v. přidavkem koncentráty (≤ 30 kDa) z bezbuněčného supernatantu izolátu/kmenů *L. sakei* izolovaných z luskovin. Hodnoty v tabulce jsou průměry (mm) radiálního růstu mycelia *B. cinnerea* a *S. sclerotiorum* obrůstajícího terčík a střední chyba průměru ze tří opakovaných měření pro každou kombinaci izolátu/kmene *L. sakei* versus fungální agens po 7 dnech kultivace při 25 °C. (Kruskal-Wallis H test, $p \leq 0,05 \leq \alpha$; Statistica Soft. 12.1). Indexy označují statisticky odlišné případy.

Izolát/kmen	akronym	<i>Botrytis cinnerea</i>	<i>Sclerotinia sclerotivorum</i>	<i>Sclerotinia sclerotivorum</i>
		myceliální terčíky	sklerocium	myceliální terčíky
<i>L. sakei</i> ssp. <i>sakei</i>	7KV1A	0±0,0	0±0,0	0±0,0
<i>L. sakei</i> ssp. <i>sakei</i>	3K01A	0±0,0	0,85±0,02 ^f	1,02±0,07 ^f
<i>L. sakei</i> ssp. <i>sakei</i>	3K02a	1,50±0,03 ^f	1,23±0,21 ^f	2,08±0,15 ^e
<i>L. sakei</i> ssp. <i>sakei</i>	1905-1	0±0,0	0±0,0	0±0,0
<i>L. sakei</i> ssp. <i>camosum</i>	CCDM 776	12,3±0,31	7,25±0,62	8,56±0,74
<i>L. sakei</i> ssp. <i>sakei</i>	CCDM 717	6,11±0,65	5,32±0,11	8,25±0,38
<i>L. sakei</i> ssp. <i>sakei</i>	CCDM 339	8,56±0,52	9,08±0,44	7,15±0,02
Kontrola 1	PDA+20% MRS	32,8±5,26 ^a	29,62±1,25 ^a	32,1±10,21 ^a
Kontrola 2	PDA	40,24±1,23 ^a	32,63±5,23 ^a	33,11±4,83 ^a
Statistické parametry		$H_{(24,176)}=12,52$; $p \leq 0,001$	$H_{(24,176)}=24,18$; $p \leq 0,001$	$H_{(24,176)}=32,21$; $p \leq 0,001$

s následnou Post Hoc analýzou (Post Hoc Tukeys' test) (Lepš a Šmilauer, 2016). Prezentovaná data představují statistické hodnoty (Df – stupně volnosti, F – hodnota kvantilů, a p – nejmenší hladina významnosti testu).

Proteomické analýzy

Obsah peptidů byl měřen v bezbuněčných supernatantech v MRS, MRS+ FGGM a v masopeptonovém médiu vhodném pro zvýšenou produkci sakacinu (MPS) (Trinetta a kol., 2008). Připravená média (MRS, MRS+FGGM a MPS) byla zaočkována 1 % anaerobně nakultivované kultury izolátů a kmenů *L. sakei*. Po 24h kultivaci ve 30 °C byl výše uvedeným způsobem získán bezbuněčný supernatant a z něho frakce 2–30 kDa.

U frakce 2–30 kDa získané z bezbuněčného supernatantu každého izolátu či kmene *L. sakei* bylo pomocí fluorometrického měření (DeNoviX QFX, Thermofisher, USA) hodnoceno množství proteinů a peptidů s využitím kitu Qubit™ Protein BR assay Kit (INVITROGEN, USA). Proteiny a peptidy by izolovány (Kavková a kol., 2023a, b) a vizualizovány na Tricine-PAGE 15% gelu (Haider a kol., 2012).

U bezbuněčných supernatantů byla také měřena acidita na počátku a po 24h kultivaci pomocí pH metru InoLab pH 720 a elektrody SenTix Sp (WTW, Německo) a měřen obsah kyselin, které jsou známé antifungálním účinkem a jsou používány jako konzervanty. Kyselina mléčná byla měřena izotachoforézou (EA 02, VILLA Labeco, Slovakia). Zastoupení a množství derivátů kyseliny mléčné (indolmléčné, hydroxymléčné, fenylmléčné) a dále kyseliny sorbové, salicylové a benzoové po 24h kultivaci v MRS a MRS+FGGM při 30 °C byla měřena a vyhodnocena metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC-PDA/MS) na pracovišti Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Výsledky a diskuze

Testování antifungálního účinku frakce ≤ 30 kDa z bezbuněčných supernatantů izolátů *L. sakei* z rostlin v po-

rovňání se sbírkovými kmeny CCDM 776, 717 a 339 ukázalo na významné rozdíly v působení na růst mycelia u *Botrytis cinnerea* a *Sclerotinia sclerotivorum* v testech *in vitro*. Izoláty *L. sakei* 7KV1A a 1905-1 zcela inhibovaly jak růst mycelia *B. cinnerea* tak *S. sclerotivorum* (Tabulka 1). Kmeny CCDM 776, 717 a 339 rovněž významně inhibovaly růst oproti kontrolním variantám, ale po sedmi dnech docházelo k mírnému nárůstu mycelia.

Všechny izoláty a kmeny *L. sakei* významně snižovaly pH kultivačních médií (Tabulka 2) během 24 h. Izolát 1905-1 snižoval pH v MRS o 27 % oproti původní hodnotě pH 5,74 a MRS +FGGM o 26 % oproti původní hodnotě 5,63. Kmeny CCDM snižovaly pH u obou médií o 25 %. K největšímu okyselení substrátu došlo během kultivace izolátů a kmenů *L. sakei* v MPS, jehož původní hodnota je 7,64 a hodnoty naměřené po 24 h byly sniženy u izolátu 1905-1 o 44 %, u kmenů CCDM o 40 %.

Tab. 2 Hodnoty pH kultivačních médií se zaočkovanými izoláty a kmeny *L. sakei* po 24h kultivaci při 30 °C včetně kontrolních hodnot sterilních médií MRS, MRS+FGGM a MPS.

Izoláty/kmeny	pH		
	MRS	MRS + FGGM	MPS
7KV1A	4,44	4,36	4,92
3K01A	5,37	5,46	6,02
3K02A	5,12	5,23	5,82
1905-1	4,19	4,18	4,45
CCDM 776	4,28	4,24	4,64
CCDM 717	4,36	4,21	4,95
CCDM 339	4,39	4,25	4,59
Kontrola – medium	5,74	5,63	7,64

Studie na izolátech *L. plantarum* a *L. pentosus* v předchozích letech ukázaly, že přidavek cukrů do MRS média významně ovlivňuje produkci funkčních metabolitů v bezbuněčných supernatantech (Kavková a kol., 2023a,b). S ohledem na výsledky inhibičních testů na růst mycelia u izolátů *L. sakei* nás zajímala kromě

Tab. 3 Hodnoty kyseliny mléčné (mg.100 ml⁻¹) v médiích zaočkovanych izoláty a kmeny *L. sakei* po 24 h kultivace při 30 °C naměřené izotachoforézou. Hodnoty představují průměr ze třech opakovaných měření a střední chyba průměru. (Statistica Soft. v12.1., ANOVA, PostHoc Tukeys' HSD test, p≤0,05≤α)

Izoláty/kmeny	Kyselina mléčná (mg.100 ml ⁻¹)	
	MRS	MRS+FGGM
7KV1A	792,20±1,23 ^c	753,75±3,18 ^c
3K01A	62,38±2,52 ^e	110,54±4,05 ^d
3K02A	67,73±1,06 ^e	52,88±2,11 ^e
1905-1	1129,52±11,30 ^a	1082,29±8,52 ^a
CCDM 776	822,94±12,06 ^b	910,65±5,63 ^a
CCDM 717	875,12±13,8 ^b	933,19±9,21 ^a
CCDM 339	759,78±6,05 ^c	861,24±3,18 ^b
Kontrola – medium	57,20±0,41	46,37±0,25
Statistické parametry	F _(7,135) =5,64; p≤0,001	F _(7,135) =11,23; p≤0,001

kyseliny mléčné a jejich derivátů také produkce kyselin, jejichž konzervačního účinku je využíváno v potravinářské praxi (sorbová, benzoová aj.). Naměřené hodnoty kyseliny mléčné ve MRS a MRS FGGM na základě naměřených hodnot z izotachoforézy (mg.100 ml⁻¹) byly v případě izolátu a kmenů *L. sakei* významně nižší v porovnání s množstvím kyseliny mléčné produkovaným kmeny *L. plantarum* a *L. pentosus* v MRS a MRS+FGGM v předešlých studiích (Kavková a kol., 2023a,b). V případě rostlinných izolátů *L. plantarum* a *L. pentosus* přidavek FGGM do MRS (Tabulka 3) významně navyšoval produkci kyseliny mléčné (Kavková a kol., 2023a), kdežto u izolátu a kmenů *L. sakei* přidavek cukrů do MRS obsah kyseliny mléčné významně nenavýšil ve srovnání s hodnotami v MRS bez přídavku cukrů. Nejvyšší hodnoty kyseliny mléčné byly naměřeny u izolátu 1905-1 (Tabulka 3). Obsah kyseliny mléčné v médiích po 24 h kultivace byl mezi izoláty *L. sakei* z rostlin významně variabilní. Zvolili jsme tedy ještě další, přesnější metodu (HPLC), která by detekovala deriváty kyseliny mléčné a jiné kyseliny, které jsou známé svým antifungálním účinkem (Meruva, 2022; Ponzio a kol., 2024).

K měření obsahu derivátů kyseliny mléčné, jako je hydroxymléčná, fenylmléčná, indolmléč-

Tab. 4 Variabilita v produkci organických kyselin izoláty a kmeny *L. sakei* v MRS a MRS+FGGM médiu. Df – stupně volnosti, F – hodnota testového kritéria porovnávající proměnné, p – hladina významnosti odpovídající 95% pravděpodobnosti testu (Faktoriální ANOVA, Statistica 12.1., p≤0,05≤α) Index * označuje statisticky významné odlišnosti v rámci testovaných kombinací.

Kyselina		DF	F	p
Hydroxymléčná*	Izoláty <i>L. sakei</i>	6	1,68	0,04*
	Kultivační médium	1	4,70	0,24
Indolmléčná*	Izoláty <i>L. sakei</i>	6	5,54	0,03*
	Kultivační médium	1	3,93	0,12
Fenylmléčná	Izoláty <i>L. sakei</i>	6	2,33	0,95
	Kultivační médium	1	3,23	0,28
Sorbová*	Izoláty <i>L. sakei</i>	6	1,69	0,65
	Kultivační medium*	1	15,59	0,01*
Salicylová*	Izoláty <i>L. sakei</i>	6	1,57	0,64
	Kultivační médium	1	4,96	0,05*
Benzoová	Izoláty <i>L. sakei</i>	6	1,54	0,48
	Kultivační médium	1	1,51	0,50

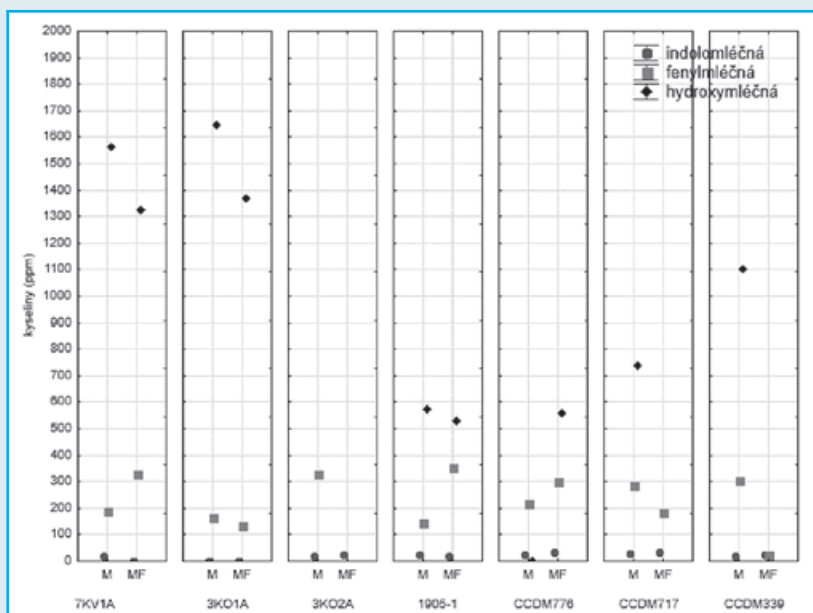
ná a dále kyselin s konzervačním účinkem, jako je sorbová, salicylová, a benzoová, jsme použili stejné bezbuněčné supernatanty z MRS a MRS+FGGM se stejnou kultivací izolátů a kmenů *L. sakei* jako pro antifungální testy. Variabilita v produkci kyselin mezi izoláty a vliv FGGM na produkci každé z kyselin, byla hodnocena analýzou variance (Tabulka 4). Izoláty a kmeny *L. sakei* se lišily pouze v produkci kyseliny hydroxymléčné a indolmléčné

Tab. 5 Množství kyseliny indolmléčné, fenylmléčné a hydroxymléčné (μg.ml⁻¹) v MRS a MRS+FGGM po 24h kultivaci izolátů *L. sakei* z rostlin a kmenů CCDM při 30 °C. Uveden je průměr a střední chyba průměru hodnot ze třech opakovaných kultivací.

kyseliny	Indolmléčná (μg.ml ⁻¹)		Fenylmléčná (μg.ml ⁻¹)		Hydroxymléčná (μg.ml ⁻¹)	
	MRS	MRS+FGGM	MRS	MRS+FGGM	MRS	MRS+FGGM
7KV1A	20,48±1,05	0±0	190,88±11,23	329,40±5,14	1564,90±2,52	1326,08±23,4
3K01A	21,12±0,18	26,51±2,15	166,69±13,40	136,88±3,12	1646,67±15,41	1371,37±13,85
3K02A	0±0	0±0	108,20±6,12	331,29±20,11	0±0	0±0
1905-1	23,83±3,02	21,99±0,25	146,78±21,31	353,34±4,21	571,37±11,44	529,61±12,74
776	25,43±2,12	34,04±0,06	216,66±13,62	303,41±7,11	0±0	557,06±16,23
717	30,01±0,03	35,73±0,30	288,01±12,71	183,50±5,74	736,86±5,87	0±0
339	21,80±1,47	24,95±1,56	305,49±15,47	240,95±4,21	1104,51±13,85	0±0
Kontrola	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

Tab. 6 Množství kyseliny sorbové, salicylové a benzoové (μg.ml⁻¹) v MRS (M) a MRS+FGGM (MF) po 24h kultivaci izolátů *L. sakei* z rostlin a kmenů CCDM při 30 °C. Uveden je průměr a střední chyba průměru hodnot ze třech opakovaných kultivací.

Kyseliny	Sorbová (μg.ml ⁻¹)		Salicylová (μg.ml ⁻¹)		Benzoová (μg.ml ⁻¹)	
	M	MF	M	MF	M	MF
7KV1A	59,39±2,15	107,59±2,56	47,56±2,16	2,12±0,14	7,32±0,05	3,13±0,52
3K01A	158,00±5,12	20,41±1,19	55,29±2,14	34,67±2,31	7,02±0,41	10,27±0,54
3K02A	144,76±0	0±0	47,07±2,12	0,14±0,16	7,02±0,24	4,95±0,32
1905-1	167,41±2,14	64,57±4,25	49,05±4,31	63,46±1,48	5,57±0,14	7,68±0,85
776	208,74±5,42	82,31±3,17	28,88±3,02	47,44±1,02	8,24±0,87	7,49±0,28
717	149,39±5,14	40,37±6,18	71,03±12,71	23,36±2,18	6,37±0,54	9,43±0,87
339	134,10±1,47	0±0	62,71±10,47	10,46±2,11	6,64±0,11	0±0
Kontrola	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0



Obr. 1 Rozdíl v produkci kyseliny indolmléčné, fenylmléčné a hydroxymléčné izoláty *L. sakei* z planých rostlin a CCDM kmeny po 24 h v kultivačních médiích M (MRS) a MF (MRS+FGGM). Hodnoty v ppm (μg.ml⁻¹).

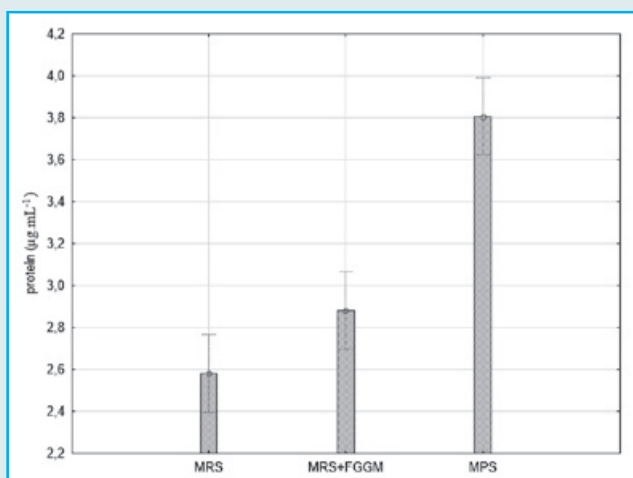
(Tabulka 5, obr. 1). Izolát z rostlin 3KO2A neprodukoval tyto dvě kyseliny vůbec, ale kyselinu fenylmléčnou produkoval ve stejném množství jako ostatní rostlinné izoláty *L. sakei*. Obecně, z derivátů kyseliny mléčné, v nejnižších množstvích byla produkována kyselina indolmléčná (Obr. 1). Kyselina hydroxymléčná buď nebyla detekovaná vůbec (izolát 3KO2A) nebo ve významně vyšších hodnotách u rostlinných izolátů (izoláty 3KV1A, 3KO1A). Kyselina fenylmléčná byla produkována všemi izoláty a kmeny bez významných rozdílů (Tabulka 4, Obr. 1). Maximální hodnota kyseliny fenylmléčné (353,54 μg.ml⁻¹) byla naměřena u izolátu 1905-1. Nejnížší produkce byla zaznamenána u izolátu 3KO1A. Přídavek cukrů (FGGM) do MRS neměl na produkci těchto kyselin průkazný vliv. Významně vyšší byla produkce kyseliny sorbové a salicylové v samotném

MRS (Tabulka 4 a 6), a to u kmenů CCDM 336, CCDM 717 a izolátu 1905-1. V MRS bez přídavku cukrů byla produkce obou kyselin významně vyšší, i když produkce (μg.ml⁻¹) kyseliny salicylové byla celkově nízká. Nejvyšší množství kyseliny sorbové bylo naměřeno rovněž v samotném MRS u CCDM 776 (206,82±5,42 μg.ml⁻¹) a u izolátu 1905-1 (167,41±2,14 μg.ml⁻¹).

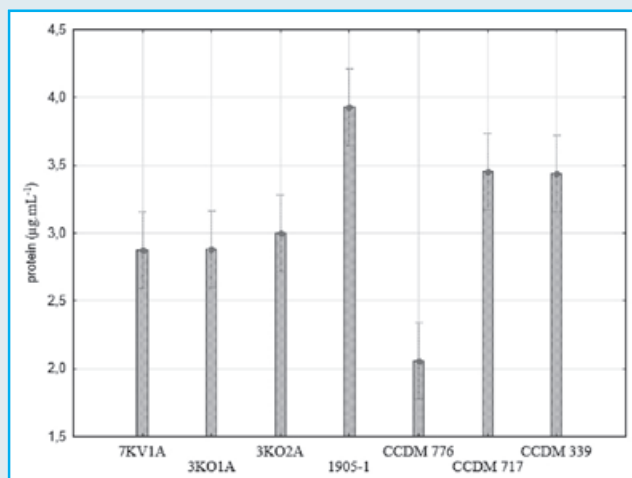
Kromě uvedených kyselin byl ve frakci ≤30kDa měřený obsah proteinů. Kromě MRS a MRS+FGGM byl měřen také obsah proteinů v MPS médiu, které indukuje tvorbu sakacinu (Trinetta a kol., 2008). Obsah proteinů byl významně vyšší v MPS (Obr. 2). Výrazným producentem proteinů a peptidů v MRS obohaceném cukry byl izolát 1905-1 (Obr. 3), zejména oproti CCDM 776, kde obsah proteinů byl nejnižší. Vzhledem k tomu, že CCDM 766 je izolován z masné matrice a patří k *L. sakei* subsp. *carneus*, nároky na výživu

a produkce extracelulárních metabolitů je odlišná (Kim a kol., 2024). Kontrola a vizualizace proteinového a peptidového spektra na 15% tricínovém gelu také prokázala intenzivní produkci peptidů v oblasti 5–1,6 kDa. Vzhledem k tomu, že zatím nedošlo k sekvenaci těchto produktů, můžeme pouze usuzovat, že by ve spektru ≤5 kDa mohlo jít o sakaciny (Trinetta a kol., 2008), ale je také možné, že jsou to zbytkové peptidy vznikající rozpadem větších proteinů.

Variabilita v antifungálním účinku i v produkci organických kyselin v rámci testovaných izolátů a kmenů ukazuje na fenotypickou a metabolickou diverzitu *L. sakei* popisovanou v několika recentních studiích (Barbieri a kol., 2022; Chen a kol., 2021). Z výsledků je patrné, že rostlinné izoláty 7KV1A a 3KO1A produkují vyšší množství



Obr. 2 Vliv kultivačního media na množství vyprodukovaných extracelulárních proteinů během 24h kultivace při 30 °C (ANOVA, PostHoc Tukey test $F_{(2, 36)} = 11,98$, $p=0,001$; STATISTICA Soft., v 12.1.)



Obr. 3 Variabilita v množství vyprodukovaných extracelulárních proteinů mezi izoláty a kmeny *L. sakei* během 24h kultivace v MRS+FGGM při 30 °C (ANOVA, PostHoc Tukey test $F_{(6, 36)} = 4,44$, $p=0,014$; STATISTICA Soft., v 12.1.)

kyseliny hydroxymléčné, ale nižší množství peptidů, kdežto izolát 1905-1 produkuje kyselinu hydroxymléčnou a fenylmléčnou v téměř stejném množství, ale oproti ostatním rostlinným izolátům produkuje významně vyšší množství proteinů a peptidů. Doposud nebyly testovány izoláty původem z rostlin čeledi *Fabaceae* s cílem zhodnocení antifungální aktivity vůči hlízence a plísni šedé. Izoláty *L. sakei* z luskovin, 7KV1A a 1905-1 představují potenciálně vhodné izoláty pro cílenou biologickou či integrovanou ochranu rostlin vůči těmto rostlinným patogenům a budou nadále s tímto cílem testovány.

Závěr

Mezi testovanými kmeny *L. sakei* ze sbírky CCDM a izoláty z planě rostoucích rostlin čeledi *Fabaceae* byly zjištěné odlišnosti v produkci organických kyselin a jejich derivátů v kultivačním médiu MRS a v MRS obohaceném cukry. I když vždy došlo k významnému okyselení media, ve srovnání s recentně testovanými izoláty *L. plantarum* a *L. pentosus* z planých rostlin izoláty *L. sakei* produkovaly méně kyseliny mléčné a minimum kyseliny octové. Izoláty *L. sakei* z rostlin produkovaly významně vyšší množství kyseliny hydroxymléčné než kmeny CCDM z mlékařských a masných matric. Množství kyseliny fenylmléčné a indolmléčné se u izolátu a kmenů *L. sakei* významně nelišilo. Přídavek cukrů do MRS produkci kyselin nezvyšoval, spíše naopak. Izolát 1905-1 a kmeny CCDM 336 a 717 produkovaly významné množství kyseliny sorbové. S ohledem na antifungální aktivitu by tyto tři kmeny mohly být vhodnými kandidáty do protektivních kultur (Shi a kol., 2022) pro potravinářské účely. Bezkonkurenčně intenzivní produkce proteinů a peptidů byla zamenána v masopeptonovém médiu (MPS), ale i obohacení media MRS o cukry významně navyšovalo produkci proteinů a peptidů ve frakci ≤ 30 kDa, a to zejména u izolátu 1905-1. Přídavek této frakce v objemu 20 % do PDA zcela inhiboval růst mycelia *Sclerotinia sclerotivorum* a *Botrytis cinerea*. Izoláty *L. sakei* z rostlin, podobně jako *L. plantarum* a *L. pentosus* v předešlých studiích, vykazují efektivní antifungální aktivitu *in vitro*, jejíž podstatou je extracelulární produkce organických kyselin a jejich derivátů s antifungálním účinkem, ale i zvýšená produkce proteinů a peptidů na vhodném živném médiu (izolát 1905-1). Využití takových izolátů v biologické ochraně rostlin v rámci ekologického zemědělství je slibným krokem s ohledem na zdraví rostlin a kvalitu rostlinných produktů v návaznosti na následné zpracování v potravinářství či krmivářství.

Poděkování:

Příspěvek vznikl za podpory projektu MZe ČR Země QK22010255 a Mze-RO1425.

Literatura:

BARBIERI, F., LAGHI, L., MONTANARI, C., LAN, Q., LEVANTE, A., GARDINI, F., TABANELLI, G. (2022): Insights into the Metabolomic Diversity of *Latilactobacillus sakei*. *Foods*, 11, s. 477.

- CARVALHO, K.G., BAMBIRRA, F.H.S., NICOLI, J.R., OLIVEIRA, J.S., SANTOS, A.M.C., BEMQUERER, M., MIRANDA, A., FRANCO, B.D.G.M. (2018): Characterization of multiple antilisterial peptides produced by sakacin P-producing *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a. *Arch. Microbiol.*, 200, s. 635–644.
- COLORETI, F., CARRI, S., ARMAFORTE, E., CHIAVARI, C., GRAZIA, L., ZAMBONELLI, C. (2007): Antifungal activity of lactobacilli isolated from salami. *FEMS Microbiol. Lett.*, (271), s. 245–250.
- DEMIRBAŞ, F., İSPIRLI, H., KURNAZ, A.A., YILMAZ, M.T., DERTLI, E. (2017): Antimicrobial and functional properties of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs, *LWT – Food Science and Technology*, 79, s. 361–366.
- FIGUEROA, H.H.R., LÓPEZ-MALO, A., MANI-LÓPEZ, E. (2024): Antimicrobial activity application fermentates from lactic acid bacteria – a review. *Sustainable Food Technology* 2, s. 292–306.
- HAIDER, S.R., REID, H., SHARP, B.L. (2012): Tricine-SDS-PAGE. Protein Electrophoresis: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*, vol. 869, s. 86–91.
- HUH, H. K., HWANG, T.I. (2016): Identification of Antifungal Substances of *Lactobacillus sakei* subsp. AL1033 and Antifungal Activity against *Penicillium brevicompactum* Strain F102 *Prev. Nutr. Food Sci.*, 21, (1), s. 52–56.
- CHEN, Y., LI, N.; ZHAO, S., ZHANG, C., QIAO, N., DUAN, H., XIAO, Y., YAN, B., ZHAO, J., TIAN, F. (2021): Integrated Phenotypic–Genotypic Analysis of *Latilactobacillus sakei* from Different Niches. *Foods*, 10, s. 1717–1723.
- KAVKOVÁ, M., BAZALOVÁ, O., CIHLÁŘ, J., BOHATÁ, A., LENCOVÁ, J., KONVALINA, P. (2023): Izolace a identifikace divokých izolátů bakterií mléčného kvašení z luskovin a hodnocení jejich funkčních vlastností *in vitro* s ohledem na využití v biologické ochraně luskovin. *Mlékařské listy* 197, vol. 34, (2), s. 7–14.
- KAVKOVÁ, M., BAZALOVÁ, O., CIHLÁŘ, J., BOHATÁ, A., LENCOVÁ, J., KONVALINA, P. (2023): Characterisation of Wild Strains of Lactic Acid Bacteria Isolated from Legumes and Their Biocontrol Potential against *Fusarium* spp. *Agronomy*, 13, s. 2911.
- KIM, E., YANG, S.-M., LEE, S.-Y., JUNG, D.-H., KIM, H.-Y. (2024): Classification of *Latilactobacillus sakei* subspecies based on MALDI-TOF MS protein profiles using machine learning models. *Microbiology*, 12, (10), 10.1128/spectrum.03668-23.
- LEPŠ, J., ŠMILAUER, P. (2016): Biostatistika. Nakladatelství Jihočeské univerzity. s. 414.
- LOPEZ-ARVIZU, A., ROCHA-MENDOZA, D., PONCE-ALQUICIRA, E., GARCÍA-CANO, I. (2021): Characterization of antibacterial activity of a Nacetyl-muramoyl-L-alanine amidase produced by *Latilactobacillus sakei* isolated from salami. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 37, s. 1–13.
- MATEO, E., TARAZONA, A., AZNAR, R., MATEO F. (2023): Exploring the impact of lactic acid bacteria on the biocontrol of toxigenic *Fusarium* spp. and their main mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 387, s. 110054.
- MERUVU, H. (2022): Redefining methods for augmenting lactic acid bacteria robustness and phenyl-lactic acid biocatalysis: Integration valorizes simplicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64, (13), s. 4397–4409.
- MINERVINI, F., LATTANZIA, A., DINARDO, F.R., DE ANGELIS, M., GOBETTI, M. (2018): Wheat endophytic lactobacilli drive the microbial and biochemical features of sourdoughs. *Food Microbiol.*, 70, s. 162–171.
- MOTTA-GUTIERREZ, J., COCOLIN, L. (2021): Current trends and applications of plant origin lactobacilli in the promotion of sustainable food systems. *Trends in Food Science & Technology*, 114, s. 198–211.
- PONZIO, A., REBECCHI, A., ZIVOLI, R., MORELLI, L. (2024): Reuterin, Phenyl-lactic Acid, and Exopolysaccharides as Main Antifungal Molecules Produced by Lactic Acid Bacteria: A Scoping Review. *Foods*, 13, s. 752.
- TRINETTA, V., ROLLINI, M., MANZONI, M. (2008): Development of a low cost culture medium for sakacin A production by *L. sakei*. *Process Biochemistry*, 43, s. 1275–1280.
- SHI, C. A MAKTABDAR, M. (2022): Lactic Acid Bacteria as Biopreservation Against Spoilage Molds in Dairy Products – A Review. *Front. Microbiol.*, 12:819684.

ŚWIECA, M., KORDOWSKA-WIATER, M., PYTKA, M., GAWLIK-DZIKI, U., BOCHNAK, J., ZŁOTEK, U. (2018): *Lactobacillus plantarum* 299V improves the microbiological quality of legume sprouts and effectively survives in these carriers during cold storage and *in vitro* digestion. *PLoS ONE*, 13, s. e0207793.

YU, A. O., GOLDMAN, E.A., BROOKS, J.T., GOLOMB, B.L., YIM, I.S., GOTCHEVA, V., ANGELOV, A., KIM, E.B., MARCO, M.L. (2021): Strain diversity of plant-associated *Lactiplantibacillus plantarum*. *Microbial biotechnology*, 14, (5), s. 1990–2008.

Korespondující autor:

Ing. Miloslava Kavková, Ph.D.

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Ke Dvoru 12a,
160 00 Praha 6, e-mail: m.kavkova@vum-tabor.cz

Předáno do tisku: 19. 12. 2024

Lektorováno: 21. 1. 2025

SVĚTOVÉ MLÉKÁRENSTVÍ V LETECH 2022–2023; VÝHLED 2024–2025

Jiří Kopáček

Českomoravský svaz mlékárenský z.s.

The world dairy in 2022–2023; outlook to 2024–2025

Abstrakt

Rešeršní článek popisující současný stav světového mlékárenství, které bylo hodnoceno na *IDF World Dairy Summit* v Paříži v říjnu 2024.

Podrobně hodnotí mlékárenský rok 2023 jako odlišný od roku předchozího, kdy došlo k opětovnému nastartování světového růstu jak ve výrobě, tak zpracování mléka a posílení mezinárodního obchodu. V návaznosti na pozvolný pokles vysoké inflace došlo k oživení spotřeby mléka a mléčných výrobků, ale výrazněji v rozvojových zemích nežli v rozvinutých západních ekonomikách. Na základě prvních dat z vývoje roku 2024 jsou naznačeny predikce výsledků tohoto roku a nastíněn střednědobý výhled pro letošní rok 2025, který začíná s vysokými cenami surovin, ale také s řadou nejistot.

Klíčová slova: mlékárenská výroba, mlékárenská spotřeba, mlékárenská statistika

Abstract

A research article describing the current state of the global dairy sector, which was assessed at the *IDF World Dairy Summit* in Paris in October 2024.

It assesses in detail the dairy year 2023 as different from the previous year, when global growth in both milk production and processing restarted and international trade

strengthened. Following the gradual decline in high inflation, the consumption of milk and dairy products recovered, but more significantly in developing countries than in developed Western economies. Based on the first data from the development of 2024, predictions of this year's results are indicated and a medium-term outlook for current year 2025 is outlined, which begins with high raw material prices, but also with a number of uncertainties.

Key words: dairy production, dairy consumption, dairy statistics

Ve druhé polovině října 2024 se v Paříži uskutečnil výroční Světový mlékárenský summit Mezinárodní mlékařské federace (IDF). Celosvětová poptávka po mléčných výrobcích v souvislosti s růstem světové populace neustále roste, což pro mlékárenský sektor znamená převzetí velké odpovědnosti o jeho rozvoj takovým směrem, aby bylo pro nové generace ještě atraktivnější a aby zajistilo další budoucí udržitelnou výživu lidí, ale také obživu lidí zejména ve venkovských oblastech. Nosný slogan summitu byl jasně určující: *Dairy 4 the Future*, tedy *Mlékařství pro budoucnost*. Při této několikadenní nejvýznamnější události loňského roku se v Paříži shromáždilo více než 1600 globálních činitelů s rozhodovací pravomocí a mlékárenských lídrů, mlékárenských expertů, vědců, technických specialistů, farmářů a dalších. Na kongresu bylo zastoupeno 62 zemí světa, odeznělo více než 100 odborných přednášek a po týdenním summitu se bylo možné účastnit pěti technických exkurzí do nejvýznamnějších mlékařských oblastí Francie.

Generální ředitelka IDF Laurence Rycken uvedla ve svém úvodním vystoupení: „*S rostoucí populací, demografickými změnami a klimatickými změnami je globální mlékárenský sektor velikou výzvou. Bude muset dělat to, co umí nejlépe: tedy být inovativní a při hledání řešení se obracet na vědu. A to je přesně to, v čem spočívá síla IDF již 120 let.*“.

Prognózy budoucího vývoje vypracovávané organizacemi jako OECD, FAO a Rabobank ukazují, že celosvětová spotřeba mléčných výrobků bude v příštím desetiletí i nadále růst. Schopnost nabídky uspokojit tuto poptávku je proto nanejvýš důležitá. Cílem summitu proto bylo identifikovat hlavní výzvy, kterým světové mlékárenství čelí, se zaměřením na každý zeměpisný region: Evropskou unii, západní Afriku, Jižní Ameriku, Spojené státy americké, Oceánii, východní a jihovýchodní Asii a Indii. Odborníci v kongresovém centru CNIT v pařížské čtvrti La Défense diskutovali o tom, jaká je budoucnost výroby a podílů na trhu v různých světových regionech, jaká jsou ale také omezení zdrojů, která by mohla znamenat kompromisní řešení, a jak se k případným kompromisům staví mlékárenský průmysl.

Summit se zaměřil rovněž na naléhavou potřebu generační výměny pracovníků v sektoru. Stárnutí zemědělské populace a pracovní síly v tomto odvětví a potíže s náborem nových zaměstnanců jsou na mezinárodní úrovni limitujícími faktory pro uspokojení rostoucí poptávky